

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine
Division des maladies infectieuses

FACULTE DE MEDECINE
Professeur A.F. MULLER
Professeur F.A. WALDVOGEL

**IMPORTANCE MICROBIOLOGIQUE
ET UTILITE CLINIQUE
DU SYNERGISME AMPICILLINE-CLOXACILLINE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Laurent BARRELET

de

BOVERESSE (Neuchâtel)

Thèse No 3497

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine
Division des maladies infectieuses

FACULTE DE MEDECINE
Professeur A.F. MULLER
Professeur F.A. WALDVOGEL

**IMPORTANCE MICROBIOLOGIQUE
ET UTILITE CLINIQUE
DU SYNERGISME AMPICILLINE-CLOXACILLINE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Jean-Laurent BARRELET

de

BOVERESSE (Neuchâtel)

Thèse No 3497

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

La Faculté de médecine, sur le préavis des professeurs Alex F. Muller et Francis Waldvogel, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 26 avril 1976

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 3497



Au professeur Alex F. Muller, ma profonde reconnaissance pour ces années passées dans son service.

Au professeur Francis Waldvogel et au docteur Claude Régamey, P.D., qui ont rendu ce travail possible par leurs conseils, leur aide constante et leur amitié.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

INTRODUCTION

De nombreuses bactéries Gram négatif, et plus particulièrement les entérobactériacées, développent leur résistance à l'Ampicilline (A) par la production de pénicillinases (β -Lactamases) qui inactivent cet antibiotique en hydrolysant le noyau β -lactame (1,2). En bloquant l'activité de ces enzymes, il devrait être possible d'éviter l'hydrolyse de l'A qui garderait ainsi toute son activité bactéricide initiale. Parmi les inhibiteurs des β -lactamases connus, la Cloxacilline (C), une pénicilline semi-synthétique, possède une grande affinité pour ces enzymes. NISHIDA et al. (3) ont montré qu'en incubant de l'A (500 μ g/ml) avec des pénicillinases intra- ou extra-cellulaires extraites de Staph. aureus ou d'E. coli, elle était dégradée dans des proportions atteignant 99 % après 2 h.; par contre, l'adjonction de C (250 μ g/ml) prévient en partie cette dégradation puisque la quantité d'A retrouvée après 2 h. d'incubation atteint environ 50 %. D'autres expériences in vitro ont confirmé que la C pouvait jouer le rôle d'inhibiteur des β -lactamases en neutralisant leur site actif et que la liaison entre la C et ces sites était stable (4-6). Il découle de ces expériences faites in vitro que l'adjonction de C permettrait de maintenir l'activité antibactérienne de l'A envers certaines souches de germes Gram négatif dont la "résistance" à cet antibiotique est due à la production de pénicillinases.

L'association A+C a un effet synergique in vitro pour certaines souches d'E. coli, de Klebsielles, de Proteus sp., d'Enterobacter et de Ps. aeruginosa (3, 5-11). Ces observations in vitro pourraient avoir d'importantes implications cliniques : l'effet synergique de l'association A+C a été démontré dans le traitement d'infections expérimentales d'animaux de la-

boratoire (7,8). Ces premiers travaux ont permis d'entreprendre un traitement d'infections urinaires chez l'homme (13-16), parce que les concentrations d'antibiotiques nécessaires à la démonstration du synergisme, relativement élevées, ne peuvent à première vue être obtenues que dans les urines; elles pourraient en particulier paraître trop élevées pour le traitement des affections systémiques. Cependant, comme ces deux antibiotiques peuvent être administrés à des doses considérables et répétées sans produire des effets secondaires importants, cette étude a été entreprise afin d'évaluer l'utilité clinique de leur association en cas de septicémie. Nous avons étudié d'une part, la prévalence des septicémies à bactéries Gram négatif résistantes à l'A, et d'autre part, la fréquence du synergisme en testant in vitro la sensibilité de ces germes à l'association A+C; enfin, nous avons comparé après perfusion de 4 g d'A et 1 g de C chez des volontaires, les taux sériques obtenus avec ceux nécessaires au synergisme démontré in vitro.

MATERIEL ET METHODES

1. Micro-organismes

Pendant une année (du 1.3.1974 au 28.2.1975), 178 germes * Gram négatif différents ont été isolés à partir des hémocultures effectuées à l'Hôpital Cantonal de Genève. Ces 178 germes se répartissaient ainsi : 91 E. coli (51 %), 38 Klebsielles (21 %), 19 Ps. aeruginosa (11 %), 12 Enterobacter (7 %), 11 Proteus (6 %) et 7 Serratia (4 %) (tabl. 1). Sur toutes ces souches un antibiogramme fut effectué selon la méthode standard ICS de

./.

* Nous avons exclu d'emblée les Salmonelles (qui étaient toutes sensibles à l'A).

diffusion en gélose (17) avec les disques d'antibiotiques suivants : Ampicilline (A) 10 μ g, Cloxacilline (C) 10 μ g, Céphalotine 30 μ g et de Carbenicilline 100 μ g. Un germe fut considéré comme résistant à l'A lorsque la zone d'inhibition autour du disque A avait un diamètre inférieur ou égal à 11 mm. Parmi les 178 germes testés, 63 (35 %) étaient A-résistants (A^R); de ces derniers toutes les entérobactériacées et 6 Ps. aeruginosa, soit 50 souches, furent retenues pour un nouvel antibiogramme, selon la même méthode, mais avec deux disques seulement, l'un contenant 25 μ g d'A, l'autre l'association de 25 μ g d'A et 25 μ g de C.

2. Démonstration du synergisme

Les souches montrant une susceptibilité accrue à l'association A+C par rapport à l'A furent soumises à une démonstration d'un éventuel synergisme par la méthode de dilution en milieu liquide (18): les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et létales (CML) d'A, de C et d'A+C envers les germes A^R furent déterminées à l'aide d'une série de tubes disposés en rangées ("checkerboard"), contenant l'A et la C dans toutes les combinaisons possibles à des concentrations croissantes (doublées dans chaque tube, de 4 à 512 μ g/ml pour A, de 8 à 256 μ g/ml pour C). Ces tubes contenaient du bouillon de Mueller-Hinton à pH 7,4 et l'inoculum de départ était d'environ 10^6 germes/ml. La viabilité des germes, ainsi que l'absence de contamination, étaient vérifiées lors de chaque expérience par des tubes témoins ne contenant que la suspension de germes. La CMI fut déterminée optiquement par la concentration d'antibiotique la plus faible inhibant la croissance visible après une incubation de 18 à 20 h. à 37° C. La CML fut définie par la concentration d'antibiotique la plus faible ayant tué 99,97 % des germes après repiquage sur une gélose de Mueller-Hinton. Les

résultats obtenus par la méthode de dilution en tubes ont été exprimés par la technique des isobologrammes qui permet une illustration graphique du synergisme de deux antibiotiques: sur une échelle arithmétique on inscrit, pour une souche donnée, en abscisse la CMI ou CML de C et en ordonnée la CMI ou CML d'A, puis on complète la courbe avec les CMI ou CML obtenues avec l'association des deux antibiotiques; lorsqu'il n'y a qu'un effet additif des deux antibiotiques, la baisse de la concentration d'un antibiotique devra être compensée par une augmentation équivalente de l'autre et la relation sera alors linéaire. En cas de synergisme, l'adjonction de petites doses de l'un des deux antibiotiques permettra une forte réduction de l'autre, et la courbe obtenue sera concave vers le bas (fig. 1). Cette technique des isobologrammes a déjà été utilisée pour la démonstration d'autres synergismes(18).

3. Détermination du pouvoir bactéricide de l'A, de la C et de A+C en fonction du temps, par comptage des germes viables ("killing curves").

Des tubes contenant du bouillon de Mueller-Hinton avec 16, 32 ou 64 $\mu\text{g/ml}$ d'A, ou 8, 16 ou 32 $\mu\text{g/ml}$ de C, ou encore la combinaison des deux (concentrations choisies selon les CML mesurées), furent ensemencés avec environ 6×10^5 germes/ml et incubés à 37° C. Dans chaque expérience, un tube contrôle ne contenait que l'inoculum, sans antibiotique. Un comptage des germes viables fut effectué après 2, 4, 8 et 24 h. par repiquage sur gélose de Mueller-Hinton, et le nombre de germes survivants fut représenté graphiquement sur une échelle logarithmique en fonction du temps (fig. 2). Dans les deux tubes ne contenant que l'A ou que la C les micro-organismes se multiplient. On peut conclure à un synergisme lorsqu'après 4 heures, le

nombre des germes comptés dans le tube contenant l'association des deux antibiotiques (A+C) est de 90 % inférieur au nombre de germes du tube ne contenant que l'A (19).

4. Dosage des antibiotiques dans le sérum et l'urine.

Le dosage séparé de l'A et de la C fut effectué en adaptant la méthode de diffusion en gélose décrite par BENNETT et al. (20) Un E. coli (NCTC 8661) fut utilisé comme germe indicateur pour le dosage de l'A à des concentrations de 32 à 512 $\mu\text{g/ml}$. Un B. subtilis (ATCC 6633) fut utilisé pour le dosage de l'A à des concentrations inférieures, soit de 2 à 32 $\mu\text{g/ml}$. Enfin, un Staph. epidermidis fut choisi pour le dosage de la C. Des expériences préalables, illustrées par la fig. 3, avaient démontré que l'adjonction de C à l'A, et ceci à des concentrations identiques à celles que l'on obtient dans le sérum, n'influençaient pas le diamètre des zones mesurées de l'A seule et vice-versa : en dosant simultanément des concentrations croissantes d'A et d'A+C ou de C et d'A+C, on obtient en effet des zones d'inhibition identiques (fig. 3). Ainsi le mélange des deux antibiotiques n'influence pas leur dosage respectif. Chaque échantillon et chaque standard fut dosé 4 fois et la moyenne des 4 mesures utilisée pour construire la courbe de référence et déterminer les concentrations inconnues.

5. Perfusion de l'association A+C chez des sujets normaux.

56 mg/kg d'A (environ 4 g) et 14 mg/kg de C (environ 1 g) dilués dans 500 ml de solution physiologique furent administrés par voie intraveineuse pendant 30 min. à l'aide d'une pompe à débit constant chez 6 jeunes adultes

en bonne santé (âge 24-27 ans; poids 60-78 kg; clearance de la créatine 112-179 ml/min/1,73 m²). Les volontaires, à jeun depuis la veille, restèrent alités et burent environ 1 litre d'eau avant le début de l'expérience pour obtenir une diurèse suffisante. Un premier échantillon veineux (temps 0) fut prélevé à travers un cathéter à prises multiples, pour la détermination de la créatinine sérique ainsi que pour la confirmation de l'absence de toute activité antibiotique dans le sérum. Par la suite, 14 échantillons veineux furent prélevés pendant une période allant de 3 min. après la fin de la perfusion à 5 ½ h. plus tard. Après chaque prise de sang, le cathéter fut rincé avec 2 ml d'une solution d'héparine à 1 %; avant la prise suivante, 5 ml de sang furent prélevés et jetés afin d'éviter toute influence de l'anticoagulation sur les dosages. Les échantillons de sang, 7 ml environ, furent immédiatement centrifugés et le sérum conservé à -20° C jusqu'au jour des dosages. Les urines furent collectées après vidange vésicale, de 0 à 2 et de 2 à 6 h. Elles furent diluées dans une solution tampon à pH 7,0, de façon à obtenir des concentrations finales inférieures à 512 µg/ml pour l'A et à 128 µg/ml pour la C. Afin d'introduire un facteur correctif pour une éventuelle perte d'activité des antibiotiques pendant le stockage, les standards furent préparés le jour de l'expérience, dans du sérum humain poolé pour les dosages sériques et dans un tampon à pH 7,0 pour les déterminations urinaires. Ces standards furent également conservés à -20° C et utilisés le jour des dosages comme valeurs de référence.

La demi-vie sérique ($T_{\frac{1}{2}}$) des antibiotiques fut calculée selon la formule

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\text{Ln}2}{K_e}$$

où Ln2 est le logarithme naturel de 2 et K_e la pente de la ligne de décroissance des concentrations sériques de l'antibiotique (constante d'élimina-

tion), pente obtenue pour chaque volontaire en reportant sur papier semi-logarithmique les taux sériques partant des valeurs mesurées 1 h. après le début de la perfusion (21). Les clearances de la créatinine et de l'A furent calculées selon la formule

$$\frac{U}{C} \times \frac{x}{t} \times V$$

où U est la concentration urinaire éliminée (créatinine ou A), V le volume urinaire, C la concentration sérique (créatinine ou A, à 4 h.) et t le temps de collection des urines.

RESULTATS

Micro-organismes et antibiogrammes.

15 des 50 souches résistantes à l'Ampicilline (A^R) testées avec les deux disques contenant l'A seule (25 μ g) et l'association A+C (25 μ g A et 25 μ g C) montrèrent des zones d'inhibition supérieures autour du disque A+C à la somme de celles obtenues indépendamment avec A et C : 7/23 E. coli (30 %), 5/14 Klebsiellles (33 %), 1/6 Ps. aeruginosa, 1/4 Enterobacter et 1/3 Serratia (tableau 1). Ces 15 souches montraient des zones d'inhibition comprises entre 12 et 14 mm autour du disque contenant les deux antibiotiques; elles étaient par ailleurs totalement résistantes à la Céphalotine (pas de zone autour du disque de 30 μ g).

Démonstration du synergisme par la méthode de dilution en tubes

Ces 15 souches montrant un effet au moins additif de A et C selon l'antibiogramme décrit, furent testées par la méthode de dilution en tubes pour démontrer un synergisme (tableau 2). Pour les 7 souches d'E. coli, les

CMI pour l'A se situaient entre 128 et 512 $\mu\text{g/ml}$. L'adjonction de C à des concentrations de 16 à 32 $\mu\text{g/ml}$ démontra son effet synergique puisque les concentrations de A nécessaires à l'effet bactériostatique purent être diminuées pour se situer entre 4 et 32 $\mu\text{g/ml}$. Cet effet se vérifia également pour les CML qui pour l'A seule se situaient entre 128 et 512 $\mu\text{g/ml}$ et qui, après adjonction de 16 ou de 32 $\mu\text{g/ml}$ de C, diminuèrent à des valeurs variant entre 4 et 64 $\mu\text{g/ml}$ (tableau 2). La figure 4 montre un exemple de synergisme démontré par cette méthode pour un E. coli qui n'est sensible qu'à 512 $\mu\text{g/ml}$ d'A, complètement résistant à la C, mais est inhibé par une association A+C de 16/64 $\mu\text{g/ml}$, 32/32 $\mu\text{g/ml}$, 64/16 $\mu\text{g/ml}$ ou encore 128/8 $\mu\text{g/ml}$. Pour les souches d'E. coli, l'association A+C permit de diminuer les concentrations des deux antibiotiques d'au moins 8 fois pour obtenir une bactériostase (tableau 2). L'effet fut nettement moins marqué pour les Klebsiellles dont les CMI déterminées avec l'association furent en général diminuées de moitié et les CML supérieures à 256 $\mu\text{g/ml}$ pour l'A seule, se sont situées entre 64 et 256 $\mu\text{g/ml}$ après adjonction de 32 $\mu\text{g/ml}$ de C (tableau 2). Le seul Ps. aeruginosa détecté par la méthode précédente et testé par la dilution en tubes était très sensible au synergisme, puisque la CMI de l'A a passé de 512 à 32 $\mu\text{g/ml}$ par l'adjonction de 32 $\mu\text{g/ml}$ de C. L'Enterobacter et la Serratia testés étaient aussi très sensibles au synergisme.

Isobologrammes

La figure 5 montre la moyenne des courbes reliant les CML des deux antibiotiques pour les 7 souches d'E. coli. La courbe se rapproche des coordonnées en prenant une forme concave, signant par là l'effet synergique de l'association.

Comptage des germes viables en fonction du temps

La figure 2 montre l'effet bactéricide des deux antibiotiques testés séparément et en association, en fonction du temps, pour une souche d'E.coli. Le nombre de germes viables est reporté sur échelle logarithmique. La croissance du germe n'est aucunement inhibée ni par 64 $\mu\text{g/ml}$ d'A ni par 16 $\mu\text{g/ml}$ de C (courbes de croissance superposables à celle du témoin sans antibiotique). Par contre, la combinaison des deux antibiotiques aux mêmes concentrations provoque une diminution de 6 log des germes viables après 4 h. par rapport au témoin et après 24 h. il n'y avait plus d'E. coli viable. Les 7 souches d'E. coli furent très sensibles au synergisme démontré par cette technique, puisque, par rapport aux contrôles, la différence était dans tous les cas de plus de 5 log après 4 h. d'incubation (fig. 6). Deux souches de Klebsiellles ont également été testées par cette méthode, pour lesquelles le synergisme apparaît alors nettement (fig. 7).

Détermination des valeurs sériques d'A et de C après administration simultanée intraveineuse chez des volontaires

La figure 8 montre les concentrations moyennes d'A et de C mesurées simultanément chez 6 jeunes adultes en bonne santé après perfusion pendant $\frac{1}{2}$ h. de 56 mg/kg d'A et de 14 mg/kg de C (soit environ 4 et 1 g). Trois minutes après l'arrêt de la perfusion, la concentration d'A était de 235 $\mu\text{g/ml}$ avec une déviation standard de 11 $\mu\text{g/ml}$. Après 1 h. la concentration moyenne était de $117 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ et après 2 h. de $43 \pm 5 \mu\text{g/ml}$. Après 5 $\frac{1}{2}$ h. il persistait des concentrations d'environ 2 $\mu\text{g/ml}$ d'A. La concentration de C fut mesurée à des valeurs de $85 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ (pic sérique trois minutes après arrêt de perfusion) puis de 32 ± 3 et $8 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ après 1 et 2 h. respectivement. Après 2 h. 3/4 il ne restait qu'environ 4 $\mu\text{g/ml}$ et à 5 $\frac{1}{2}$ h.

les valeurs étaient inférieures à celles détectées par notre technique. Les concentrations des deux antibiotiques ont chuté de façon exponentielle, puisque les courbes de décroissance sérique, transcrites sur papier semi-logarithmique, donnent une fonction qui a un coefficient de corrélation de 0,99 avec une droite.

La $T_{1/2}$ d'A, calculée sur les 12 échantillons prélevés de 1 à 5 h. après la fin de la perfusion fut de 0,8 h. (47 ± 3 min., moyenne pour les 6 volontaires). La $T_{1/2}$ de C, calculée avec 4 à 6 valeurs entre 1 et 2 $3/4$ h. après la fin de la perfusion, était plus courte : 0,5 h. (31 ± 3 min.). La demi-vie plus courte de la C a de ce fait modifié le rapport des concentrations sériques A/C qui était de 4/1 à 1 h. et de 5/1 à 2 h.

Les concentrations urinaires dépendent naturellement du volume excrété. Entre 0 et 2 h. après l'administration d'A, elles se situaient entre 1300 et 4100 $\mu\text{g/ml}$, avec un taux d'élimination de $55,8 \pm 3,9$ % de la dose administrée (fig. 9). Pour la C, pendant la même période, les concentrations variaient de 400 à 2200 $\mu\text{g/ml}$ avec une élimination de 39 ± 3 %. Entre 2 et 6 h. après l'administration, les concentrations se situaient à plus de 200 $\mu\text{g/ml}$ pour l'A (élimination de 15 ± 5 %) et à plus de 40 $\mu\text{g/ml}$ pour la C (élimination de $5,6 \pm 1,8$ %). La figure 9 montre qu'après 6 h., 71 % environ de l'ampicilline administrée et 45 % de la cloxacilline ont été excrétés.

La clearance rénale de l'A, calculée chez 5 volontaires à partir de l'excrétion urinaire entre 2 et 6 h. et de la concentration sérique d'A à 4 h., fut de 318 ± 123 ml/min/1,73 m².

DISCUSSION

Une septicémie à bactéries Gram négatif nécessite l'instauration rapide d'un traitement antibiotique afin d'éviter le développement d'un état de choc irréversible; on ne peut donc attendre l'identification bactériologique du germe responsable ni la détermination de sa sensibilité envers les différents antibiotiques. Pour cette raison, et du fait de la grande variété de ces micro-organismes, de nombreux traitements empiriques ont été proposés, allant de l'Ampicilline seule à l'association de plusieurs autres antibiotiques (22-26). Plusieurs de ces associations sont cependant grevées d'une haute toxicité; en revanche, l'Ampicilline seule ne couvre certainement pas toutes les éventualités comme par exemple les septicémies à Klebsielles, à Ps. aeruginosa ou Proteus indole-positif. A l'Hôpital cantonal de Genève, un malade présentant un tableau clinique de septicémie à bactéries Gram négatif était souvent traité initialement à l'Ampicilline seule, considérée comme l'antibiotique de choix pour la très grande majorité des germes en cause. Nos résultats ont cependant montré qu'un tiers des bâtonnets Gram négatif (à l'exclusion des Salmonelles, toutes sensibles à l'Ampicilline) isolés à partir d'hémocultures étaient résistants à cet antibiotique. D'autres traitements, si possible sans effets secondaires, doivent donc être envisagés, et une possibilité consisterait à potentialiser l'effet antibactérien de l'Ampicilline par l'adjonction d'un autre antibiotique sans toxicité appréciable, tel que la Cloxacilline.

L'association Ampicilline/Cloxacilline (A+C) a donné des résultats favorables à court terme dans les infections urinaires grâce aux concentrations urinaires élevées de ces deux antibiotiques (13-16). En raison même de l'importance des concentrations nécessaires pour obtenir un effet synergi-

gique (souvent plus de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'A) le bénéfice de cette association pour le traitement des septicémies a été mis en doute (6, 10, 11). L'absence d'étude systématique à ce sujet, ainsi que la faible incidence d'effets secondaires des pénicillines nous ont incités à étudier l'intérêt clinique d'une telle association. Une étude in vivo ne pouvait cependant être entreprise qu'après l'étude quantitative de ce synergisme in vitro en utilisant comme souches-tests des germes obtenus à partir de patients présentant des hémocultures positives. L'étude de ces souches devrait en effet permettre de tirer des conclusions sur l'utilité in vivo de l'association A+C car il ne s'agit pas d'une sélection de souches bactériennes particulières. C'est ainsi que toutes les bactéries Gram négatif, isolées à partir des hémocultures effectuées à l'Hôpital cantonal de Genève pendant une période d'un an, ont été étudiées quant à leur sensibilité envers l'Ampicilline. L'étude a alors porté sur la susceptibilité des bâtonnets Gram négatif résistants à l'Ampicilline, à l'association A+C. Nous avons alors tenté de déterminer les concentrations d'Ampicilline et de Cloxacilline nécessaires à un effet synergique, puis de comparer ces résultats avec les concentrations sériques obtenues après infusion intraveineuse de la dose unitaire actuellement commercialisée, soit 4 g d'Ampicilline et 1 g de Cloxacilline.

Les antibiogrammes effectués selon la méthode standard ICS de diffusion en gélose (17) peuvent déjà suggérer un effet additif (que nous montrons être synergique par la suite) de l'association A+C sur certaines souches. En effet, seules les souches Ampicilline-résistantes, sensibles à un effet de synergie, ont des zones d'inhibition mesurables (diamètres de 12 à 24 mm) autour du disque contenant 25 μg d'Ampicilline et 25 μg de Cloxacilline. Cette méthode permet donc de déceler rapidement les souches Gram négatif sensibles à l'association A+C sans avoir recours à des examens plus complexes.

Le synergisme suspecté par les antibiogrammes de diffusion en gelose fut confirmé dans tous les cas par des méthodes plus précises: la méthode de dilution en milieu liquide ("checkerboard") et de comptage des germes viables en fonction du temps ("killing curves"). Les 7 souches d'E.coli, une souche d'Enterobacter et une souche de Serratia furent les plus sensibles au synergisme puisque leur croissance fut inhibée par des concentrations inférieures ou égales à 32 $\mu\text{g/ml}$ d'Ampicilline en ajoutant de 4 à 32 $\mu\text{g/ml}$ de Cloxacilline et ceci en utilisant un inoculum très riche (10^6 germes/ml). D'autre part, en débutant l'incubation avec 6×10^5 germes/ml en présence des concentrations d'Ampicilline et de Cloxacilline choisies pour leur effet bactériostatique dans la méthode de dilution en milieu liquide, nous avons compté moins de 10^2 E. coli/ml après 24 h.; ce qui démontre que le synergisme de l'association ne se manifeste pas seulement après une diminution très importante des germes viables (de plus de 5 log sur une échelle logarithmique) après 4 h., mais qu'il aboutit à un effet pratiquement bactéricide.

Confirmant les résultats obtenus avec la méthode de dilution en tubes, les souches de Klebsielles furent néanmoins moins sensibles à cet effet synergique. Ceci est peut-être partiellement expliqué par le fait que la Cloxacilline est un moins bon inhibiteur des β -lactamases des Klebsielles. On sait que les entérobactériacées synthétisent des β -lactamases différentes dont l'affinité pour les isoxazolylpénicillines et autres agents bloquants est variable (4, 27). Pour les Klebsielles, Hamilton-Miller (28) a montré que la méthicilline est un meilleur inhibiteur des pénicillinases.

Pour déterminer l'utilité clinique éventuelle du synergisme en cas d'infection systémique, des volontaires ont reçu une perfusion intraveineuse de 4 g d'Ampicilline et de 1 g de Cloxacilline, soit un flacon de la dose

unitaire actuellement commercialisée. Cette dose permet d'obtenir des taux sériques maxima élevés : 235/85 $\mu\text{g/ml}$ d'Ampicilline et de Cloxacilline. Pendant l'heure qui suit la fin de la perfusion, les concentrations sériques mesurées restent supérieures aux concentrations minimales lésales déterminées in vitro pour les souches sensibles au synergisme.

Cependant, l'association de 4 g d'Ampicilline et de 1 g de Cloxacilline présente un certain nombre d'inconvénients. En premier lieu, le rapport des deux antibiotiques n'est pas toujours le meilleur puisque, comme le montre le tableau 2, la plus forte réduction des concentrations d'Ampicilline nécessaires au synergisme est parfois obtenue par l'adjonction de concentrations souvent égales ou supérieures de Cloxacilline. D'autre part, la Cloxacilline est éliminée plus rapidement que l'Ampicilline ($T_{\frac{1}{2}}$ de 0,5 h. contre 0,8 h. pour l'Ampicilline). Un rapport Ampicilline/Cloxacilline de 3g/2g ou même de 2g/2g donnerait des concentrations sériques correspondant de façon plus adéquate aux exigences microbiologiques et donnerait des taux sanguins bactéricides pendant une période plus prolongée. Une association 2g/2g tiendrait également mieux compte de l'observation de Metzger, lequel a démontré que l'effet bactéricide dépendait de la dose de Cloxacilline utilisée (29). Enfin, la combinaison 2g/2g aurait l'avantage de comprendre suffisamment de Cloxacilline pour traiter une éventuelle septicémie à Staph. aureus.

Les concentrations sériques des deux antibiotiques mesurées dans cette étude ne peuvent que difficilement être comparées avec les données de la littérature, où les doses utilisées sont généralement inférieures et les modes d'administration différents. Les demi-vies plasmatiques calculées (0,8 h. pour l'Ampicilline et 0,5^h pour la Cloxacilline) sont comparables aux chiffres publiés précédemment : 0,8 et 1,0 h. pour l'Ampicilline (30, 31),

0,6 h. pour la Cloxacilline (30, 32). Il en est de même pour la clearance rénale de l'Ampicilline : 318 ± 123 ml/min/1,73 m², qui chez d'autres auteurs fut de 210 et 341 ml/min/1,73 m² (30, 33). Ces résultats montrent que l'adjonction de Cloxacilline ou d'Ampicilline ne modifie pas la pharmacocinétique des deux antibiotiques, ce qui est intéressant vu leur élimination par des mécanismes communs et saturables.

Les E. coli sensibles au synergisme A+C sont également tous sensibles à la Carbénicilline selon la méthode standard ICS de diffusion en gélose, les diamètres des zones d'inhibition se situant entre 21 et 30,5 mm autour du disque contenant 100 µg de Carbénicilline. Nous avons également déterminé les CMI pour cet antibiotique et trouvé des taux relativement élevés : pour 2 souches, les CMI atteignaient 256 µg/ml, concentration rarement atteinte chez des malades traités aux doses habituelles (30). Pour ces souches, un effet bactéricide in vivo serait probablement plus aisément obtenu avec l'association A+C qu'avec la Carbénicilline seule.

Cette étude a été effectuée sur des germes présentant une importance clinique indiscutable, puisqu'ils proviennent d'hémocultures de malades hospitalisés et présentant une affection systémique. Elle permet de conclure que l'adjonction de Cloxacilline à des concentrations judicieuses devrait permettre à l'Ampicilline d'exercer son pouvoir bactéricide vis-à-vis d'un certain nombre de bactéries Gram négatif par ailleurs résistantes à cet antibiotique. Dans des cas bien précis de septicémie, une telle association devrait ainsi diminuer le risque d'une monothérapie initiale insuffisante, sans augmenter pour autant les risques d'effets secondaires.

Tableau 1

BACTERIES GRAM NEGATIF ISOLEES DANS DES SEPTICEMIES

GENEVE 1974 - 1975

	Nb de souches	Nb de souches A-résistantes 1)	Nb de souches à sensibilité envers A+C supérieure à A et C mesurée in- dépendamment 2)
E. coli	91 (51 %)	23	7
Klebsielles	38 (21 %)	14	5
Enterobacter	12 (7 %)	4	1
Proteus sp.	11 (6 %)	0	-
Serratia	7 (4 %)	3	1
Ps. aeruginosa	19 (11 %)	19	1*
Total	178 (100 %)	63	15

1) diamètre des zones $\leq$ 11 mm autour du disque de 10 μ g d'A.

2) diamètre des zones plus grand autour du disque contenant A et C que la somme des diamètres mesurés autour de A et de C indépendamment.

* 6 souches seulement ont été testées.

Tableau 2

Démonstration du synergisme A+C par la méthode de dilution en tubes ("checkerboard").
Résultats obtenus avec 15 souches d'organismes Gram négatif résistantes à l'A.

souches	CMI A $\mu\text{g/ml}$	CMI A/C $\mu\text{g/ml}$	CML A $\mu\text{g/ml}$	CML A/C $\mu\text{g/ml}$
1 <u>E. coli</u>	256	8/32	256	8/32
2 "	256	32/32	512	64/32
3 "	128	4/32	256	8/32
4 "	256	8/32	512	8/32
5 "	512	32/32	512	32/32
6 "	128	4/32	128	4/32
7 "	256	16/32	256	16/32
8 <u>Klebsiella sp.</u>	256	128/32	512	128/64
9 "	128	128/32	256	64/64
10 "	128	64/32	256	64/64
11 "	128	64/32	256	128/64
12 "	64	64/32	256	64/64
13 <u>Entérobacter</u>	16	8/16	32	8/16
14 <u>Serratia</u>	64	32/ 8	256	64/32
15 <u>Ps. aeruginosa</u>	512	32/32	512	256/64

Figure 1

Isobologramme pour illustrer le synergisme de deux antibiotiques : l'adjonction de petites doses de l'un des deux antibiotiques permet une forte réduction de l'autre et la courbe est concave. Un effet purement additif est représenté par une droite.

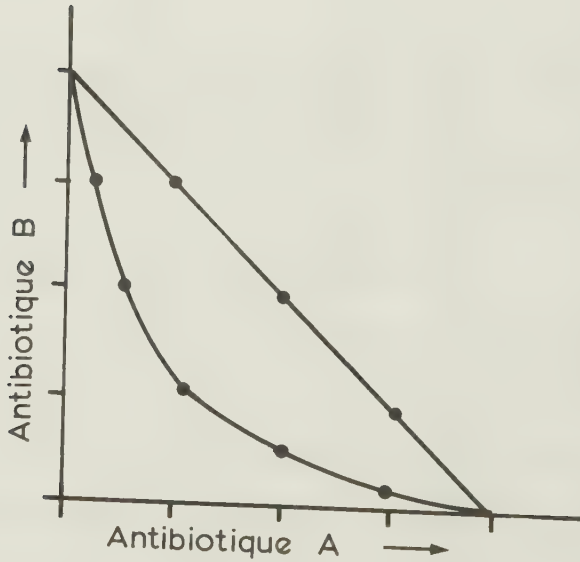


Figure 2

Illustration du synergisme par comptage des germes viables en fonction du temps ("Killing curves"). Exemple pour une souche d'E. coli dont la croissance n'est inhibée ni par 64 $\mu\text{g/ml}$ d'A, ni par 16 $\mu\text{g/ml}$ de C, mais diminue avec l'association A+C avec effet bactéricide après 24 h.

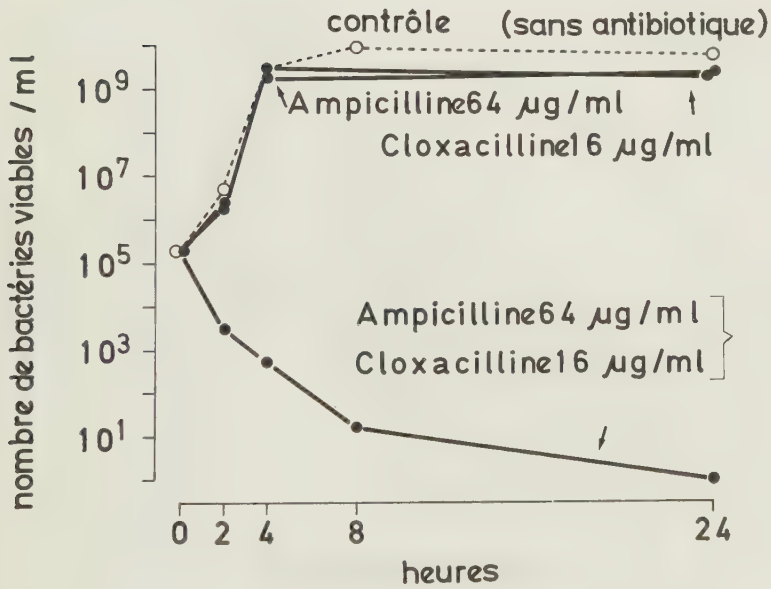


Figure 3

Dosages simultanés d'A seule et d'A mélangée avec de la C jusqu'à des concentrations atteignant 128 $\mu\text{g/ml}$ ainsi que de la C seule et de la C mélangée avec de l'A à des concentrations atteignant 256 $\mu\text{g/ml}$. Toutes les courbes sont superposables.

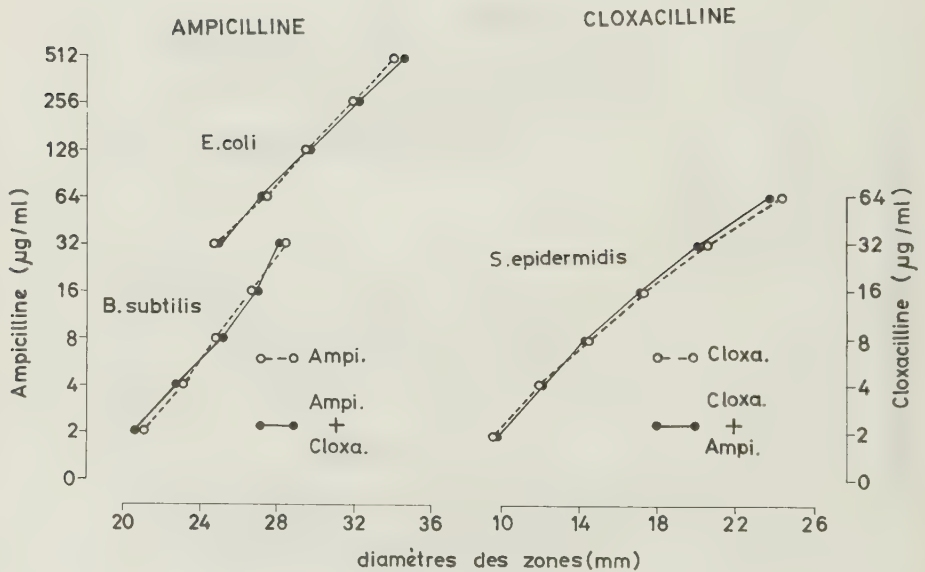


Figure 5

Isobologramme. Moyenne des courbes (avec déviations standards) reliant les concentrations minimales létales de la combinaison des 2 antibiotiques pour les 7 souches d'E. coli. La courbe est concave, signant l'effet synergique.

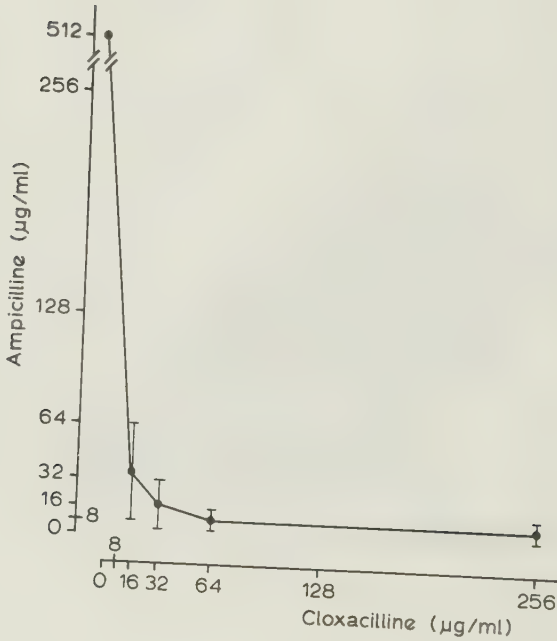


Figure 6

Comptage des germes viables en fonction du temps ("killing curves").
Courbe moyenne (avec déviation standard) pour les 7 souches d'E. coli montrant que la diminution du nombre des germes viables avec A+C est de plus de 5 log sur une échelle logarithmique par rapport aux courbes d'A ou de C seules qui sont superposables à la courbe témoin (sans antibiotique).

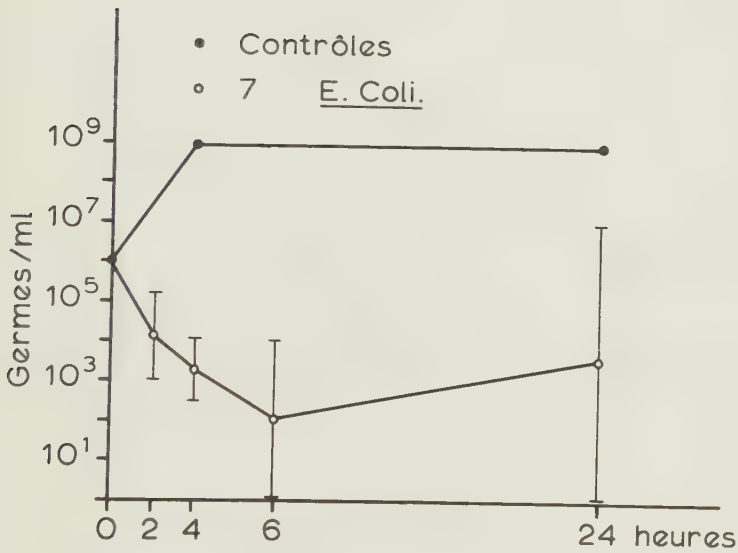


Figure 7

Comptage des germes viables en fonction du temps ("killing curves").

Courbes pour 2 souches de Klebsielles illustrant également le synergisme.

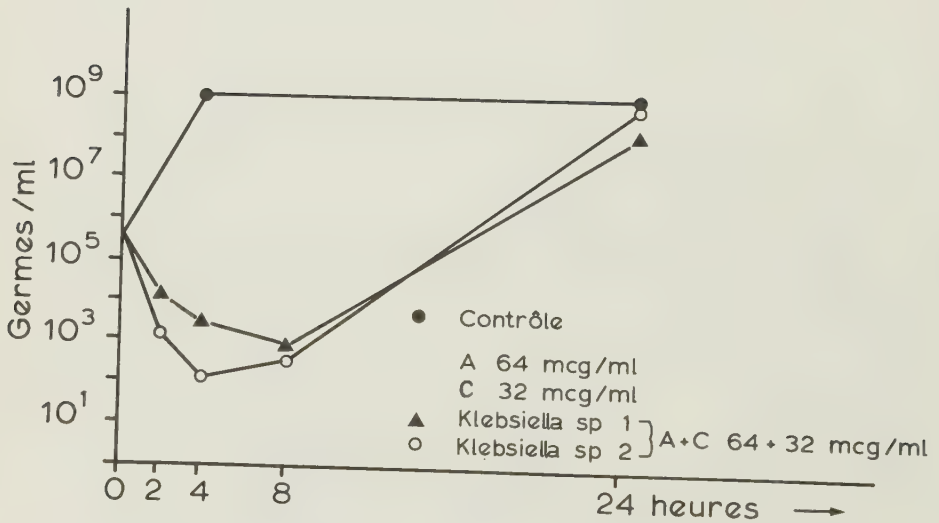


Figure 8

Courbes de décroissance sérique des concentrations d'A et de C mesurées chez 6 volontaires après infusion de 4 g d'A et de 1 g de C. Chaque point représente la moyenne des 6 valeurs avec la déviation standard.

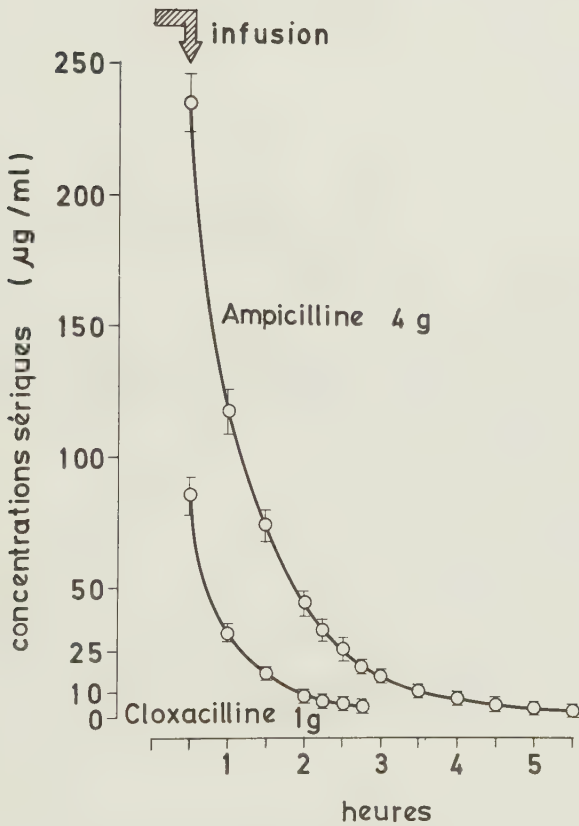
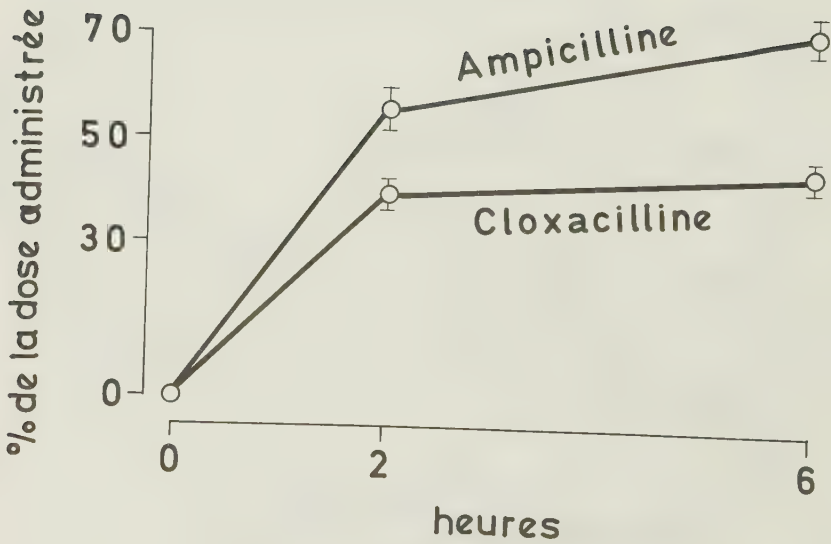


Figure 9

Elimination urinaire d'A et de C en fonction du temps, exprimée en % de la dose administrée. Chaque point représente une moyenne de 6 valeurs avec la déviation standard.



RESUME

Il a été démontré dans des expériences in vitro, notamment par NISHIDA et al. (3) et BORNSIDE (10), que l'association Ampicilline-Cloxacilline (A+C) pouvait être synergique envers certaines souches de bâtonnets Gram négatif; en d'autres termes, l'association de ces deux antibiotiques est bactéricide pour certains micro-organismes à des concentrations auxquelles ces agents antibactériens n'ont aucune activité lorsqu'ils sont utilisés seuls.

L'importance thérapeutique de cette association a été explorée dans le traitement des infections urinaires (13-16) mais pas en cas de bactériémie à germes Gram négatif. Pour ces raisons, nous avons étudié le synergisme de cette association in vitro sur 50 souches de bactéries Gram négatif isolées à partir d'hémocultures provenant de malades septicémiques. Sur un collectif de 23 souches d'E. coli résistantes à l'Ampicilline (A) - pour lesquelles les concentrations minimales létales (CML) étaient égales ou supérieures à $128 \mu\text{g/ml}$ -, 7 ont été détruites par des concentrations de $4-32 \mu\text{g}$ d'A, lorsqu'associées à $16-32 \mu\text{g/ml}$ de Cloxacilline (C). Ces 7 souches étaient par ailleurs résistantes à la Céphalotine. Un tel synergisme fut également démontré pour 1 souche sur 4 d'Enterobacter, 1 souche sur 3 de Serratia, 5 souches sur 14 de Klebsiellles et 1 souche sur 6 de Ps. aeruginosa.

Dans une deuxième série d'expériences, six volontaires en bonne santé reçurent une perfusion intraveineuse de 56 mg/kg (environ 4 g) d'A et 14 mg/kg (environ 1 g) de C pendant 30 minutes. Les concentrations sériques maximales mesurées furent de 235 ± 11 (déviatiion standard) pour l'A et

$85 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ pour la C. Une et deux heures après la fin de la perfusion, les taux de A/C étaient respectivement de 117/32 et 43/8 $\mu\text{g/ml}$. La $T_{1/2}$ d'A était de 0,8 h. et celle de la C, 0,5 h. Pendant l'heure qui suivait l'arrêt de la perfusion, les concentrations sériques des deux antibiotiques étaient supérieures à celles nécessaires au synergisme démontré in vitro.

Ainsi, l'adjonction de C à une perfusion d'A en cas de septicémie à germe Gram négatif, peut, dans certains cas, augmenter par synergisme le pouvoir bactéricide du sérum, sans pour autant exposer le malade à un risque accru d'effets secondaires.

SUMMARY

The combination of ampicillin (A) and cloxacillin (C) has been shown to be bactericidal in vitro against some gram negative bacteria at concentrations at which neither of the two antibiotics has any activity against these organisms.

The potential clinical importance of this synergism is the subject of this report. 50 A resistant gram negative rods from septicemic patients were tested for synergism : 7 out of 23 E. coli strains with a minimal bactericidal concentration (MBC) of $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ were killed by 4-32 $\mu\text{g/ml}$ A with 16-32 $\mu\text{g/ml}$ C. These 7 strains were also resistant to cephalothin. Synergism was also found with 1/4 Enterobacter, 1/3 Serratia, 5/14 Klebsiella and 1/6 Pseudomonas. In the second part of this study, six healthy volunteers received 56 mg/kg (approximately 4 g) A and 14 mg/kg (approximately 1 g) C over 30 min. intravenously. Simultaneously measured peak serum levels were 235 ± 11 (SEM) $\mu\text{g/ml}$ A and 85 ± 7 $\mu\text{g/ml}$ C. One and two hours after the end of the infusion, the levels of A and C were 117/32 and 43/8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. $T_{1/2}$ of A was 0,8 and of C 0,5 h. Up to one hour after the end of the infusion, the serum levels of A and C were higher than the concentrations which showed in vitro synergism. Thus, when A is given for gram negative septicemia, the adjunction of C can - in certain circumstances - increase the bactericidal effect of the serum without increasing the risk of side effects.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sawai T, Mitsunashi S, Yamagishi S : Drug resistance of enteric bacteria.
XIV. Comparison of β -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin.
Jap. J. Microbiol. 12 : 423-434; 1968.
2. Smith JT, Hamilton-Miller JMT, Knox R : Bacterial resistance to penicillins and cephalosporins.
J. Pharm. Pharmac. 21 : 337-358; 1969.
3. Nishida M, Mine Y, Kuwahara S : Synergistic activity of ampicillin and cloxacillin.
J. Antib. 22 : 144-150; 1969.
4. O'Callaghan CH, Morris A : Inhibition of β -lactamases by β -lactam antibiotics.
Antimicrob. Ag. Chemother. 2 : 442-448; 1972.
5. Farrar WE Jr, O'Dell NH, Krause JM : Use of penicillinase-resistant penicillins to increase the susceptibility of gram-negative bacteria to antibiotics.
Ann. Intern. Med. 67 : 733-743; 1967.
6. Hamilton-Miller JMT, Smith JT : Inhibition of penicillinases from gram-positive and gram-negative bacteria by substrate analogue.
Nature 201 : 999-1001; 1964.
7. Hamilton-Miller JMT, Smith JT, Knox R : Potentiation of penicillin action by inhibition of penicillinase.
Nature 201 : 867-868; 1964.
8. Bach JA, Buono N, Chisholm D, Price KE, Pursiano TA, Gourevitch A : In vitro and in vivo synergism of mixtures of penicillins
Antimicrob. Ag. Chemother. 1966 : 328-336; 1967.
9. Sabath LD, Abraham EP : Synergistic action of penicillins and cephalosporins against Ps. pyocyanea.
Nature 204 : 1066-1069; 1964.

10. Bornside GH : Synergistic antibacterial activity of ampicillin-cloxacillin mixtures against Proteus morganii.
Appl. Microbiol. 16 : 1507-1511; 1968.
11. Shirley RL, Moore JM : Ps. aeruginosa urinary tract infection.
N. Engl. J. Med. 273 : 283; 1965.
12. Sutherland R, Batchelor FR : Synergistic activity of penicillins against penicillinase-producing gram-negative bacilli.
Nature 201 : 868-869; 1964.
13. Sabath LD, Gerstein DA, Leaf CD, Finland M : Increasing the usefulness of antibiotics : Treatment of infections caused by gram-negative bacilli.
Clin. Pharm. Ther. 11 : 161-167; 1970.
14. Sabath LD, McCall CE, Steigbigel NH, Finland M : Synergistic penicillin combinations for treatment of human urinary tract infections.
Antimicrob. Ag. Chemoth. 1966 : 149-155; 1967.
15. Sabath LD, Elder HA, McCall CE, Finland M : Synergistic combinations of penicillins in the treatment of bacteriuria.
N. Engl. J. Med. 277 : 232-238; 1967.
16. Klastersky J, Debusscher L, Ruhl D : Bacteriological and clinical evaluation of the combination of cloxacillin with ampicillin.
Chemotherapy (Basel) 17 : 382-391; 1972.
17. Ericsson HM, Sherris JC : Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. Suppl. 217; 1971.
18. Sabath LD, Barry AI : Special tests : bactericidal activity and activity of antimicrobics in combination : Manual of clinical microbiology, édité par Lennette EH, Spaulding EH, Truant JP, 2ème éd. American society for microbiology, Washington DC, pp. 431-435; 1974.
19. Jawetz E : Combined antibiotic action : Some definitions and correlations between laboratory and clinical results.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1967 : 203-204; 1968.

20. Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM : Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens.
Appl. Microbiol. 14 : 170-177; 1966.
21. Goldstein A, Aranow L, Kolman S : Principles of drug action.
Harper and Row, New-York, pp. 196, 287, 295; 1968.
22. Hassen A : Gram-negative bacteremic shock.
Med. Clin N. Amer. 57 : 1403-1415; 1973.
23. McHenry MC, Hawk WA : Bacteremia caused by gram-negative bacilli.
Med. Clin. N. Amer. 58 : 623-638; 1974.
24. Garrod LP, Lambert HP, O'Grady F : Antibiotic and chemotherapy, 4ème ed.
Churchill Livingstone, Edinburgh and London, pp. 307-309; 1973.
25. Boedeker EC, Dauber JH : Manual of medical therapeutics, 21ème ed.
Little Brown and Company, Boston, p. 224; 1975.
26. Handbook of antimicrobial therapy. The medical letter on drugs and therapeutics. pp. 14-15; Janvier 1974.
27. Farrar WE Jr, Newsome JK : Mechanism of synergistic effects of β -lactam antibiotic combinations on gram-negative bacilli.
Antimicrob. Ag. Chemother. 4 : 109-114; 1973.
28. Hamilton-Miller JMT : Penicillinase from Klebsiella aerogenes.
Biochem. J. 87 : 209-214; 1963.
29. Metzger K : Synergistische Wirkung der Kombination Ampicillin mit Isoxasolyl-penicillin.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24 : 471-476; 1974.
30. Standiford HC, Jordan MC, Kirby WMM : Clinical pharmacology of carbenicillin compared with other penicillins.
J. Infec. Dis. 122 : S 9-13; 1970.
31. Dittert LW, Griffin WO Jr, La Piana JC, Shainfeld FJ, Doluisio JT : Pharmacokinetic interpretation of penicillin levels in serum and urine after intravenous administration.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1969 : 42-48; 1970.

32. Rosenblatt JE, Kind AC, Brodie JL, Kirby WMM : Mechanisms responsible for the blood level differences of isoxazolyl penicillins.
Arch. Intern. Med. 121 : 345-348; 1968.
33. Jusko WJ, Lewis GP : Comparison of ampicillin and hetacillin pharmacokinetics in man.
J. Pharm. Sci. 62 : 69-76; 1973.
-

